نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۵۷-۲۴۷

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 2, Summer 2019, p. 247-257

شناسایی جهش‌های $FecX^I$، $FecX^H$ و $FecX^B$ در ژن *BMP15* در گوسفند نژادهای لک قشقایی و بهمئی در استان کهگیلویه و بویر احمد

مصطفی محقق دولت‌آبادی[1*] -اسما مرادعلی‌پور[2] - فرخنده منصوری[2] - فرنگیس فتاحی[2] - زینب صالحی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۸

چکیده

نرخ باروری یکی از صفات مهم اقتصادی در گوسفند است، که تحت تأثیر ژنتیک و محیط می‌باشد. ژن *BMP15* یکی از ژن‌های موثر بر این صفت می‌باشد و جهش‌های مختلف در این ژن باعث تغییر راندمان صفات تولیدمثلی و رشد در گوسفند می‌شود. چنانکه باروری بالا در گوسفندان به علت جهش در جایگاه *BMP15* با منشأ اووسیتی (ژن فاکتور رشد) شناخته شده است. در این مطالعه از روش PCR-RFLP برای شناسایی چند شکلی جایگاه‌های ژنی $FecX^I$، $FecX^H$ و $FecX^B$ استفاده شد. بدین منظور از تعداد ۹۲ رأس میش نژاد لک قشقایی و بهمئی به طور تصادفی خون‌گیری صورت گرفت و استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA انجام شد. قطعات مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (قطعه ۲۰۴ bp از $FecX^I$، قطعه ۲۳۵ bp از $FecX^H$ و قطعه ۱۵۳ bp از ژن $FecX^B$)، و توسط واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) تکثیر گردید. پس از مجاورت محصولات PCR با آنزیم‌های اختصاصی (*Xba*I، *Spe*I و*Dde*I)، مشاهده گردید که همه قطعات $FecX^I$ و $FecX^H$ فاقد جایگاه برش برای آنزیم هضم‌کننده بوده و تنها یک الگوی باندی در آن‌ها مشاهده شد. این مطالعه تنها وجود آلل‌های تیپ وحشی را تأیید کرد. تمامی نمونه‌ها دارای ژنوتیپ هموزیگوت بودند و جهش اینوردل و هانا (جهشی که در حالت هتروزیگوت باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری می‌شود) در آن‌ها یافت نشد. براساس نتایج این مطالعه، ژن *BMP15* نمی‌تواند تأثیری بر میزان چندقلوزایی در گوسفندان مورد مطالعه داشته باشد، بنابراین باید به دنبال جهش‌ها یا ژن‌های دیگری بود.

واژه‌های کلیدی: باروری، چندشکلی، ژن *BMP15*، گوسفند.

مقدمه

گوسفند نژادهای لک قشقایی و بهمئی از نژادهای بومی استان کهگیلویه و بویراحمد می‌باشند که به عنوان سرمایه ملی کشور به حساب می‌آیند. این گوسفندان به دلیل داشتن مقاومت زیاد در مقابل کمبود علوفه، عادت داشتن به راهپیمایی زیاد در مسیرهای کوهستانی، چرا در مراتع فقیر و تخریب یافته، مقاومت در برابر بیماری‌ها مخصوصاً بروسلوز و نیز مقاومت به تغییرات آب و هوایی، نژاد مناسب عشایر این استان می‌باشند اما میزان باروری در این گوسفندها نسبتاً پایین است. دامداران نیز با مشاهده زادآوری پایین، روز به روز از نژادهای پر بازده خارجی استفاده می‌کنند از این رو تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی با مشکل مواجه شده است. از طرفی به کارگیری روش‌های سنتی اصلاح نژاد نظیر انتخاب و آمیزش (بر اساس داده‌های فنوتیپی) به منظور افزایش تعداد بره در هر زایش، به دلیل پایین بودن وراثت‌پذیری این صفت، دارای روندی کند و پر هزینه است. بنابراین، تلاش برای کشف ژن‌های موثر بر چندقلوزایی و موتاسیون‌های مؤثر بر نرخ تخمک‌گذاری و به تبع آن بره زائیده شده در هر زایش، در میان متخصصین اصلاح نژاد در چند دهه اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۲۱).

براساس مطالعات ژنتیکی انجام گرفته جهش‌های تک نوکلئوتیدی دارای اثرات مهمی روی چندقلوزایی و تخمک‌گذاری هستند. ژن‌های حامل این جهش‌ها را ژن‌های باروری یا *Fec* می نامند. یکی از این ژن‌ها *BMP15* می‌باشد که روی کروموزوم X قرار دارد و به *Fec*X معروف است (۳۰). جهش *Fec*X اولین بار در گوسفندان بلکلار ایرلند که میزان تخمک‌گذاری بالایی داشتند، مشاهده شد (۲۰). ژن‌های BMP، بر تنظیم بیان و ترشح

۱. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
(*-ایمیل نویسنده مسئول: mmuhaghegh@yu.ac.ir)
DOI: 10.22067/ijasr.v11i2.70188

هورمون‌های موثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک‌اندازی موثر هستند و توسط تخمک تولید می‌شوند. این ژن‌ها در توسعه جنین، هموستازی، تعمیر و اصلاح الگوهای بافتی مختلف، تمایز سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش دارند (۳۰). ژن *BMP15*، تکثیر و تمایز سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های در حال رشد را از طریق افزایش تقسیم میتوز، مهار بیان گیرنده‌های FSH و تحریک بیان کیت لیگاند (Kit Ligand) تنظیم می‌کند. بنابراین این ژن نقشی محوری در باروری دام‌ها دارد (۹). ژن *BMP15* اولین ژنی بود که ارتباط آن با افزایش نرخ تخمک‌اندازی در گوسفندان اینوردل (چند شکلی *FecX*ᴵ) و هانا (چند شکلی *FecX*ᴴ) گزارش شد (۱۴). بلافاصله پس از آن پلی مورفیسم بورولا (*Fec*Bᴮ) در ژن *BMPR1B* در گوسفندان بورولا مرینو شناسایی شد (۸). ژن‌های *BMP15* (دسته پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی)، *BMPR-IB* (گیرنده نوع B پروتئین مورفوژنتیک استخوانی) و *GDF9* (فاکتور متمایز کننده رشد) از مهم‌ترین ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی و تخمک‌گذاری هستند که در نژادهای مختلف گوسفند، مورد مطالعه گسترده قرار گرفته‌اند (۲۰). ژن *GDF9* در گوسفندان کمبریج و بلکلیر مسئول افزایش نرخ تخمک‌اندازی در هتروزیگوت‌ها و ناباروی در هموزیگوت‌ها، بسیار مشابه به پلی مورفیسم‌های ژن *BMP15* می‌باشد. وجود همزمان جهش در ژن‌های *BMP15* و *GDF9* برای هر دو جایگاه باعث تأثیر افزایشی آن‌ها بر یکدیگر و منجر به چندقلوزایی زیادتر نسبت به حالت جهش منفرد در یک ژن شده است (۲۰). این ژن‌ها با میزان اثر متفاوت بر روی نرخ تخمک‌اندازی و چندقلوزایی، دریچه جدیدی را برای پرورش‌دهنده گان گوسفند جهت افزایش درصد برەزایی فراهم کرده است. ژن *BMP15* یکی از اعضای سوپر خانواده TGFβ می‌باشد و دارای دو اگزون است که توسط یک اینترون به طول ۵/۴ کیلو باز از همدیگر جدا می‌شوند. محصول رونویسی کامل آن‌ها یک توالی ۱۱۷۹ نوکلئوتیدی بوده که کدکننده یک پیش پپتید به طول ۳۹۳ اسید آمینه است در حالی که پپتید کامل آن ۱۲۵ اسید آمینه طول دارد (۱۵). تاکنون ۸ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (*FecX*ᴳ، *FecX*ᴵ، *FecX*ᴮ، *FecX*ᴿ، *FecX*ᴸ، *FecX*ᴴ، *FecX*ᴼ، *FecX*ᴳʳ) در این ژن گزارش شده (۴، ۸، ۲۰) که بعضی از آن‌ها با صفات باروری در گوسفندان نژادهای مختلف در ارتباط است. در این میان جهش‌های *FecX*ᴵ و *FecX*ᴴ بر افزایش نرخ تخمک‌اندازی تأثیر بسزایی داشته‌اند (۸). جهش‌های *FecX*ᴮ،*FecX*ᴸ و *FecX*ᴵ باعث جایگزینی اسید آمینه غیر محافظه کارانه به ترتیب در جایگاه‌های ۳۱، ۵۳ و ۹۹ می‌گردند. اما جهش‌های *FecX*ᴮ و *FecX*ᴳ باعث ایجاد یک کدون توقف در جایگاه‌های ۲۳۹ و ۲۹۱ ژن *BMP15* می‌شوند که ظاهراً به شکل فعال و بالغ محصول بیولوژیکی آسیب می‌رسانند (۲۸).

بررسی خصوصیات تولیدمثلی خصوصاً ژن‌های مؤثر بر تولیدمثل در سال‌های اخیر در کشورمان به منظور تعیین خصوصیات ژنتیکی رواج زیادی یافته است و تاکنون چند شکلی اگزون ۲ ژن *BMP15* در نژادهای سنجابی (۴۰)، دالاق (۲۳) و سنگسری (۳۶) مورد بررسی قرار گرفته است و در نژاد سنجابی چند شکلی در اگزون ۲ این ژن با دوقلوزایی و صفات وزنی مرتبط بوده است. بنابراین با توجه به تأثیر افزایش چندقلوزایی بر میزان گوشت تولیدی، این مطالعه به شناسایی جهش‌های مؤثر بر چندقلوزایی و تخمک‌گذاری (*FecX*ᴵ، *FecX*ᴴ و *FecX*ᴮ) در ژن *BMP15* از گوسفندان نژاد لک قشقایی و بهمئی استان کهگیلویه و بویراحمد پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۹۲ رأس از میش‌های نژاد لک قشقایی (۲۴ رأس تک قلوزا و ۲۴ رأس دوقلوزا)، و بهمئی (۲۲ رأس تک قلوزا و ۲۲ رأس دوقلوزا)، از دو گله به ترتیب در گچساران و کهگیلویه جمع‌آوری، سپس از سیاهرگ وداجی آن‌ها خون‌گیری انجام شد. از لوله‌های آزمایش استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA برای خون‌گیری استفاده شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج منتقل گردید و در فریزر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ماده ژنتیکی هر نمونه با استفاده از کیت استخراج DNA (AccuPrep® genomic DNA extraction kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی نیز با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردید. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت 10 μg/μL انجام شد. به منظور بررسی جهش و تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم‌ها، قطعاتی از ژن *BMP15* به کمک تکنیک PCR و توسط آغازگرهای اختصاصی *FecX*ᴵ (۹)، *FecX*ᴴ (۲۲) و *FecX*ᴮ (۲۰) که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است، تکثیر شدند. برای شناسایی پلی مورفیسم‌های موجود در این ژن‌ها از روش PCR- RFLP استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی های آغازگرها برای سه ناحیه از ژن *BMP15*
Table 1- Primer properties of *Fec*X^I, *Fec*X^H and *Fec*X^B of *BMP15* gene

ژن Gene-allele	نوع آغازگر Type	توالی آغازگر Primer sequences	طول قطعه (جفت باز) Fragment length (bp)	منبع Reference
*Fec*X^I	Sense Antisense	GGCAGTATTGCATCGGAAGTTCC CATGATTGGGAGAATTGAGACC	204	Davis et al., 2002
*Fec*X^H	Sense Antisense	TATTTCAATGACACTCAGAG GAGCAATGATCCAGTGATCCCA	235	Hua et al., 2008
*Fec*X^B	Sense Antisense	GCCTTCCTGTGTCCCTTATAAGTATG TTCCCCTTA TTCTTGGGAAACCTGAGCTAGC	153	Hanrahan et al., 2004

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کمک کیت لیوفیلیزه بایونیر (شرکت تکاپوزیست) انجام گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر قطعه *Fec*X^I شامل دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ چرخه شامل سه مرحله: دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه اعمال شد (۲۱). سپس ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR با ۵ واحد از آنزیم محدودالاثر *Xba*I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت تحت عمل هضم قرار گرفت. در حالت ژنوتیپ جهش یافته، قطعه ۲۰۴ بازی تکثیر شده از محصول PCR توسط آنزیم *Xba*I به دو قطعه ۸۱ و ۱۲۳ بازی برش داده می‌شود. در میش‌های ژنوتیپ وحشی آنزیم قادر به شناسائی و برش جایگاه مذکور نیست.

برنامه حرارتی برای تکثیر قطعه *Fec*X^H شامل دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل به ترتیب دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۱-۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. جهت هضم آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR در معرض ۵ واحد از آنزیم محدودالاثر *Spe*I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت قرار گرفت. این آنزیم قادر به شناسائی و برش جایگاه A/CTAGT می‌باشد به طوری که در این قطعه، آنزیم روی الل وحشی اثر نداشته ولی آلل جهش یافته را به دو قطعه ۶۸ و ۱۶۷ جفت بازی برش می‌دهد. بنابراین ژنوتیپ جهش یافته دارای دو باند ۶۸ و ۱۶۷ جفت بازی و ژنوتیپ وحشی دارای یک باند ۲۳۵ جفت بازی است.

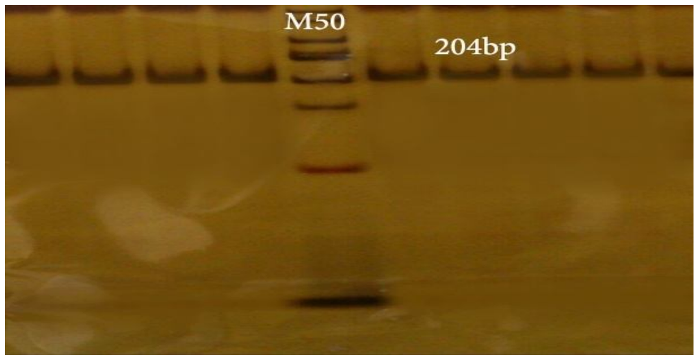
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه *Fec*X^B با ۳۵ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای واسرشت اولیه و ثانویه و دمای مناسب برای اتصال، ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه) در دستگاه ترموسایکلر Xp Cycler (ساخت کشور چین) انجام گردید. این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر با محتویات ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱/۵ میلی‌مول MgCl2، ۰/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۱۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده، انجام شد. پس از پایان PCR، محصولات بدست آمده با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند و قطعات ۱۵۳ جفت بازی برای ژن FecX^B مشاهده گردید. سپس محصولات بدست آمده برای شناسایی جهش‌های FecX^B با آنزیم‌های اختصاصی *Dde*I (Fermentas) به مدت یک شب تیمار گردیدند. بدین منظور مقدار ۶ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Dde*I (غلظت 10 u/µL) با استفاده از آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد. واکنش به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در صورتی که جهش مورد نظر وجود داشته باشد باند ۱۵۳ جفت بازی بدون تغییر باقی می‌ماند، اما در صورتی که جهش وجود نداشته باشد، باند ۱۵۳ جفت بازی به وسیله آنزیم به دو باند ۱۲۲ و ۳۱ جفت بازی شکسته می‌شود (۲۰ و ۲۲). پس از پایان هضم، محصولات بدست آمده بر روی ژل پلی اکریلآمید ۱۰ درصد ران شده و ژنوتیپ‌ها به روش رنگ آمیزی نیترات نقره تعیین شدند.

نتایج و بحث

مشاهده یک باند ۲۰۴ جفت بازی برای جفت آغازگر *Fec*X^I، یک باند ۲۳۵ جفت بازی برای جفت آغازگر *Fec*X^H و باند ۱۵۳ جفت بازی برای *Fec*X^B، نشان دهنده تکثیر درست قطعات انتخاب شده ژن *BMP15* و صحت انجام PCR بود. عدم وجود کشیدگی و شفاف بودن باندها، نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی بود و مشاهده تنها یک باند، نشان از آغازگرهای اختصاصی است که تنها دارای یک قطعه هدف روی DNA الگو بود.

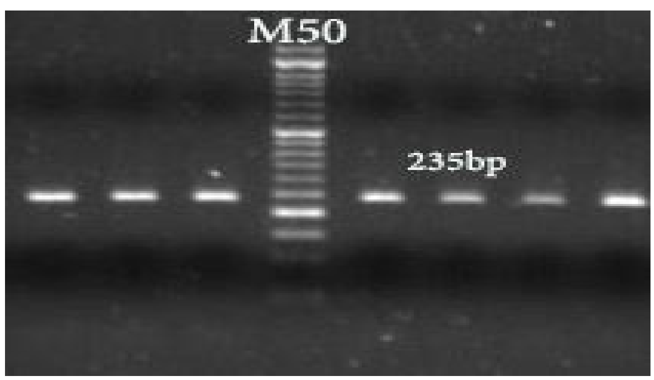
پس از هضم آنزیمی قطعات ۲۰۴ و ۲۳۵ به ترتیب با آنزیم‌های محدودگر *Xba*I و *Spe*I، هیچ‌کدام از جایگاه‌ها برش داده نشد و هیچ

تفاوتی بین حیوانات مختلف مشاهده نشد و تمامی گوسفندان دارای آلل‌های وحشی بودند (شکل ۱و۲). همچنین الگوی باندی مشاهده شده در الکتروفورز پس از هضم آنزیمی، وجود جهش *Fec*X^B را در نژادهای لک قشقایی و بهمئی استان کهگیلویه و بویراحمد نشان نداد به طوری که پس از تیمار محصولات PCR با آنزیم *Dde*I همه قطعات ۱۵۳ جفت بازی برش خوردند و باندهای ۱۲۲ و ۳۱ جفت بازی برای ژن *Fec*X^B مشاهده گردید (شکل ۳).



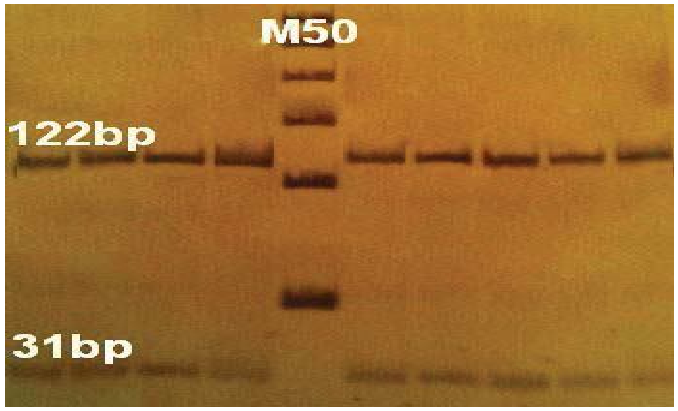
شکل ۱- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم ژن *BMP15* توسط آنزیم *Xba*I با مارکر ۵۰ bp

Figure 1- Electrophoresis of digestion products of BMP15 gene by *Xba*I enzyme using 50bp size marker



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم ژن *BMP15* توسط آنزیم *Spe*I با مارکر ۵۰ bp

Figure 2- Electrophoresis of digestion products of *BMP15*gene by *Spe*I enzyme using 50bp size marker



شکل ۳- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم ژن *BMP15* توسط آنزیم *Dde*I با مارکر ۵۰ bp
Figure 3- Electrophoresis of digestion products of *BMP15* gene by *Dde*I enzyme using 50bp size marker

بنا بر نتایج این پژوهش، کل جمعیت مورد مطالعه هموزیگوت (ژنوتیپ وحشی) بودند. این گوسفندان با محیط سازگاری کامل یافته و میزان تنوع جایگاه‌های مورد مطالعه صفر است.

مطالعه ژن‌های *GDF9* و *BMP15* در گوسفندان ایرانی نشان‌دهنده عدم وجود جهش‌های بزرگ اثر می‌باشد که در حالت هموزیگوت منجر به عقیمی می‌گردد (۱۳، ۱۶ و ۳۲) با این حال جهش‌های کوچک اثر در این ژن‌ها در گوسفندان ایرانی وجود دارد (۱۲، ۴۶ و ۴۷). پولی و همکاران (۳۷) به بررسی چند شکلی $FecX^B$ پرداختند که نتایج حاصل از این بررسی، پلی مورفیسم در این جایگاه را در نمونه‌هایی از گوسفندان گارول هندی نشان نداد. شاه محمدی (۳۹) به شناسایی پلی مورفیسم در قطعه ۱۵۳ جفت بازی از اگزون ۲ ژن *BMP15* در نمونه‌هایی از گوسفندان نژاد زل پرداخت که نتایج حاصل، حاکی از عدم وجود جهش در این جایگاه بود. گزارش گنجعلی (۱۷) نیز حاکی از عدم وجود جهش برای $FecX^B$ در نمونه‌هایی از این نژاد بود. علی‌نقی‌زاده و همکاران (۲) به بررسی پلی مورفیسم $FecX^B$ در بز سرخ جبال بارز پرداختند که نتایج حاصل، پلی مورفیسم در این جایگاه را نشان نداد و عدم وجود جهش برای $FecX^B$ در نمونه‌هایی از این نژاد با نتایج حاصل از بررسی حاضر مطابقت دارد. در مطالعه هوا و همکاران (۲۲) که روی شش نژاد چینی بوئر (Boer)، هایمن (Haimen)، هونقایی (Huanghuai)، نوبی (Nubi)، متیو (Matou)، و جنینگ خاکستری (Jining Grey)، انجام گردید، جهش $FecX^B$ مشاهده نشد. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه پولی و همکاران (۳۸) که روی نژاد چندقلوزای بنگال سیاه هندی انجام گردید، بدست آمد. طی مطالعه‌ای که روی ۱۰۹ بز بومی ایرانی انجام گردید، جهش $FecX^B$ در بزهای این نژاد مشاهده نشد (۴۱). خان احمدی و همکاران (۲۳) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP به بررسی پلی مورفیسم $FecX^B$ از ژن *BMP15* در گوسفندان نژاد دالاق پرداختند که نتایج حاصل از این بررسی نیز حاکی از عدم وجود جهش در نمونه‌های مورد بررسی بود، و تمامی این مطالعات با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد. لین و همکاران (۲۵)، جهش $FecX^B$ را در بزهای سه قلوزا و نرهای نژاد سفید گیژو مشاهده کردند.

نتایج بدست آمده در این مطالعه در مورد پلی مورفیسم $FecX^I$ با نتایج تحقیقات انجام شده در گوسفندان نژاد لری بختیاری (۳)، نژاد شال (۲۱)، نژاد هان چین (۲۶)، هیو یانگ و مرینو چینی (۴۳)، ۲۱ نژاد گوسفند از ۱۳ کشور از جمله نژادهای شرقی رومانوف، فین و فریزین (۱۰)، گوسفندان مصری (۱)، گوسفند گارول هندوستان (۳۷)، گوسفند شمال آفریقا (۴۲)، ساکیز یونانی (۲۹)، گوسفندان بومی ترکیه (۱۹)، بربرین تونسی (۵)، سه نژاد از گوسفندان شیلی (۳۵) و گوسفند نژاد ساکیز (۱۱) که همگی دارای ژنوتیپ تیپ وحشی می‌باشند، مطابقت دارد. همچنین این نتایج با نتیجه حاصل از نژاد چندقلوزای رامنی اینوردل مغایرت داشت. محققان میزان فراوانی ژن در گوسفند نژاد رامنی اینوردل را حدود ۰/۲۱ بدست آوردند (۳۳). در واقع ژن *BMP15* با تغییر در پروتئین‌های ساخته شده باعث افزایش حساسیت سلول‌های گرانولوزا به FSH گردیده و در نتیجه باعث افزایش رشد فولیکول‌ها و ایجاد تخمک‌گذاری در فولیکول‌های کوچکتر حاملین هتروزیگوت می‌گردد (۴۴ و ۴۵). اما در حاملین هموزیگوت، تخمدان‌ها کوچک، دوکی شکل و غیر فعال بوده، رشد فولیکول‌ها در زمان جنینی متوقف گردیده و در مرحله اولیه باقی مانده‌اند. این فولیکول‌ها در دام‌های بالغ نیز فاقد تخمک می‌باشند. همچنین در این افراد میزان FSH و LH نسبتاً بالاست اما میزان استرادیول و اینهیبین قابل شناسایی نیست (۱۵). بنابراین حاملین هتروزیگوت این جهش‌ها بارور و دارای یک یا دو تخمک‌گذاری بیشتر از حالت عادی

هستند در حالی که حاملین هموزیگوت نابارور و دارای تخمدان‌های کوچک هستند (۴، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۱).

در مطالعه حاضر بررسی نتایج حاصل از هضم آنزیمی، الگوی باندی یکسانی (۲۳۵ bp) را نشان داد که حاکی از عدم وقوع جهش در جایگاه $FecX^H$ در میش‌های نژاد لک قشقایی و بهمئی می‌باشد. نتایج این مطالعه با مطالعات انجام شده روی گوسفندان نژاد هان و هو در چین (۶ و ۷)، گوسفند گارول (۳۷) و گوسفند شمال آفریقا (۴۲) مطابقت دارد و تمامی گوسفندان دارای ژنوتیپ تیپ وحشی می‌باشند ولی با نتایج حاصل از نژاد رامنی هانا مغایرت داشت (۳۳). جهش هانا نیز در حالت هتروزیگوت باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری می‌شود و در حالت هموزیگوت جهش یافته باعث عقیم شدن میش می‌شود. افزایش باروری در گوسفندان هتروزیگوت راسا آرانگوسای اسپانیایی به دلیل فقدان توالی ۱۷bp از ژن *BMP15* می‌باشد، این محققین نشان دادند که گوسفندان هموزیگوت فاقد آلل جهش یافته، نابارور هستند (۲۷).

از آنجایی که پروتیئن کدشده توسط ژن *BMP15* در رشد فولیکول تخمدانی دخالت می‌کند، تغییر در جایگاه های مهم این پروتیئن می‌تواند بر میزان باروری میش‌ها نقش بسزایی داشته باشد. جهش C/T در جایگاه ۶۷+ ژن *BMP15* در میش‌های دارای پلی مورفیسم $FecX^H$ منجر به تغییر اسیدآمینه گلوتامین در جایگاه ۲۳ به یک کدون خاتمه می‌شود. همچنین جهش T/A در جایگاه ۹۲+ این ژن در میش‌های دارای جهش $FecX^I$، منجر به جایگزینی اسید آمینه آسپارژین به جای اسید آمینه والین در جایگاه ۳۱ این پروتئین می‌شود (۱۴).

مطالعات انجام گرفته روی نژادهای مختلف گوسفند ایرانی نشان می‌دهند که تاکنون برخی از جهش‌های مؤثر بر چندقلوزایی، شناسایی نشده است. احتمالاً یا این جهش‌ها در آن نژادها وجود داشته و بعداً از بین رفته است یا جهش‌های ناشناخته دیگری عامل چندقلوزایی می‌باشند و هنوز شناسایی نشده‌اند و یا اصلاً این جهش‌ها از نژادهای منبع به آن‌ها وارد نشده است. به طور کلی محیط پرورشی می‌تواند بر عملکرد ژن‌های موثر بر باروری تأثیر گذار باشد و شاید بتوان اینگونه تفسیر نمود که طبیعت ایران برای ماندگاری و تداوم نسل گوسفندان واجد ژن جهش یافته مزبور مناسب نبوده است و این جهش‌ها صلاحیت ماندگاری نداشته‌اند. در مطالعه‌ای که روی جهش FecB انجام گردید به این نتیجه رسیدند که منشاء این جهش، گوسفندان نژاد گارول هندی بوده است که در قرن ۱۸ میلادی تعدادی از این گوسفندان با کشتی به استرالیا منتقل و پس از تلاقی این نژاد با گوسفندان مرینو، جهش FecB به آن‌ها منتقل گردیده است (۸ و ۱۰). نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که تنها جهش‌های شناخته شده ژن *BMP15*، از عوامل ژنتیکی مؤثر بر چندقلوزایی نمی‌باشند بلکه جهش‌های شناخته شده و یا ناشناخته دیگر می‌توانند از عوامل مؤثر بر چندقلوزایی باشند که لازم است در جمعیت‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرند (۱۸، ۴۴). از جمله مطالعاتی که اخیراً رواج پیدا کرده است تلاقی حاملین ژن‌های بزرگ اثر با دیگر نژادها می‌باشد. از جمله این تلاقی‌ها می‌توان به تلاقی گوسفندان گارول حامل ژن بزرگ اثر FecB با گوسفندان مالپورا، دکانی و بنر اشاره نمود که باعث انتقال ژن بزرگ اثر FecB به این نژادها و بهبودی وضعیت تولیدمثلی آن‌ها گردیده است (۲۴ و ۳۴). بنابراین با استفاده از این روش می‌توان با تلاقی نژادهای ایرانی با نژادهای حامل ژن‌های بزرگ اثر اقدام به اصلاح ژنتیکی دام‌های ارزشمند ایرانی نمود.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه به منظور شناسایی حیوانات دارای باروری بالا، چند شکلی‌های $FecX^I$، $FecX^H$ و $FecX^B$ که نقش موثری در باروری دارند در جمعیت گوسفندان نژاد لک قشقایی و بهمئی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از عدم وجود جهش‌های ذکر شده در گوسفندان تک‌قلوزا و دوقلوزای نژادهای مورد مطالعه بود. از آنجا که در این پژوهش تنها یک ژنوتیپ (آلل نوع وحشی) برای جایگاه‌های مورد مطالعه شناسایی شده است، می‌توان چنین تفسیر نمود که مکانیسم مولکولی موثر بر صفت چندقلوزایی در این دو نژاد تحت تأثیر پلی مورفیسم‌های این ژن قرار ندارد. همانطور که گفته شد صفت چندقلوزایی جزء صفات پلی ژن می‌باشد که تاکنون جهش‌های موثر بر این صفات در ژن‌های عمده *BMP15*، *BMPR-IB* و *GDF9* شناسایی شده است، بنابراین باید به دنبال مناطق دیگری از ژنوم این گوسفندان بود که تاکنون شناسایی نشده‌اند. پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات مختلف، تعداد بیشتری از گوسفندان مورد بررسی قرار گیرند.

منابع

1- Abulyazid, I., H. M. Sharada, M. S. Abdalla, H. M. Saleh, and W. F. Hassanin. 2011. FecX1 gene as a monitor for the production of twins in the Egyptian sheep. Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences, 1(4): 217-219.

2- Alinaghizadeh, H., M. R. MohammadAbadi, and S. Zakizadeh. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology, 2(1): 69-80. (In Persian).

3- Amiri, A., G. H. Rahimi Miyanji, and M. Vatankhah. 2008. Absence of allelic polymorphisms in Broula (FecB) and FecX1 gene in Lori-Bakhtiari breed sheep. Journal of Genetics-Novin, 3(4): 57-63. (In Persian).

4- Bodin, L., E. Di Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, P. Monget, L. Persani, and P. Mulsant. 2007. A novel mutation in the BMP15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacunae sheep. Endocrinology, 148: 393-400.

5- Borni, J., B. Sonia, and D. M. Naouer. 2011. Study for identification FecXI and FecXH mutations in Tunisian Barbarine sheep. Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences, 1(2): 112-115.

6- Chu, M. X., Z. H. Liu, C. L. Jiao, Y. Q. He, L. Fang, S. C. Ye, G. H. Chen, and J. Y. Wang. 2006. Mutations in BMPR-IB and BMP15 genes are associated with litter size in small tailed Han sheep (*Ovis aries*). Animal Science, 85: 598-603.

7- Chu, M., R. Cheng, G. Chen, L. Fang, and S. Ye. 2004. Study on bone morphogenetic protein 15 as a candidate gene for prolificacy of small tail Han sheep and Hu sheep. Journal of Anhui Agricultural University, 32(3): 278-282.

8- Davis, G. H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genetics Selection Evolution, 37: 11–23.

9- Davis, G. H., S. M. Galloway, I. K. Ross, S. M. Gregan, J. Ward, B. V. Nimbkar, P. M. Ghalsasi, C. Nimbkar, G. D. Gray, Subandriyo, I. Inounu, B. Tiesnamurti, E. Martyniuk, E. Eythorsdottir, P. Mulsant, F. Lecerf, J. P. Hanrahan, G. E. Bradford, and T. Wilson. 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. Biology of Reproduction, 66: 1869-1874.

10- Davis, G.H., L. Balakrishnan, I. K. Ross, T. Wilson, S. M. Galloway, B. M. Lumsden, J. P. Hanrahan. M, Mullen, X. Z. Moa, G. L. Wang, S. Z. Zhao, Y. Q. zeng, j. J. Robinson, A. P. Mavrogenis, C. Papachristoforou, c. Peter, R. Baumung, P. Cardyn, I. Boujenanel, n. E. Cockett, E. Eythorosdottir, J. J. Arranz, and D. R. Notter. 2006. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale ($FecX^I$) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science, 92: 87–96.

11- Dinçel, D., S. Ardiçli, B. Soyudal, M. Er., F. Alpay, H. Șamli, and F. Balci. 2015. Analysis of FecB, BMP15 and CAST gene mutations in Sakiz sheep. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21(4): 483-488.

12- Eghbalsaied, S., H. Amini, S. Shahmoradi, and M. Farahi. 2014. Simultaneous presence of G1 and G4 mutations in growth differentiation factor 9 gene of Iranian sheep. Iranian Journal of Applied Animal Research, 4: 781-785. (In Persian).

13- Eghbalsaied, S., K. Ghaedi, S. Shahmoradi, A. Pirestani, H. Amini, T. Saiedi, L. Nicol, and A. McNeilly. 2012. Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. Iranian International Journal of Fertility and Sterility, 5: 225–230 (In Persian).

14- Galloway, S. M., K. P. McNatty, L. M. Cambridge, M. P. E. Laitinen, J. L. Juengel, T. S. Jokiranta, R. J. Mclaren, K. Luiro, K.G. Dodds, G. W. Montgomery, A. E. Beattie G. H. Davis, and O. Ritvos. 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics, 25: 279–283.

15- Galloway, S. M., S. M. Gregan, T. Wilson., K. P. McNatty, J. L. Jungel, O. Ritvos, and G. H. Daivis. 2002. BMP15 mutations and ovarian function. Molecular and Cellular Endocrinology, 191: 15-18.

16- Ghaffari, M., A. Nejati-Javaremi, and G. Rahimi-Mianji. 2009. Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. South African Journal of Animal Science, 39: 355-360.

17- GhangAhi. H., Gh. L. Mohamade, H. Ghale dare, and M. R. Afzal Zadeh. 2015. The study of mutations $FECX^B$ and $FECX^G$ in Kamvry goats in Khuzestan province. Iranian Journal of Genetics in the Third Millennium, 2: 3528-3535. (In Persian).

18- Guan, F., S. R. Liu, G. Q. Shi, and L. G. Yang. 2007. Polymorphismof FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. Animal Reproduction Science, 99: 44-52.

19- Gursel, F. E., I. Akis, H. Durak, A. Mengi, and K. Oztabak. 2011. Determination of BMP15, BMPR-1B and GDF-9 gene mutations of the indigenous sheep breeds in Turkey. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 17(5): 725-729.

20- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell, and S. M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biology of Reproduction, 70: 900-909.

21- Hedayat Iveregh, N., R. Meraeiashtiani, and A. Nejati Javaremi. 2011. Investigate the presence of polymorphisms in genes $FecX^I$ and $FecX^H$ associnted with twin formation in Shal sheep. Journal of Genetic Novin, 6(4): 29-34. (In Persian).

22- Hua, G. H., S. L. Chen, J. T. Ai, and L. Yang. 2008. None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. Animal Reproduction Science, 108: 279-286.

23- Khanahmadi, A., S. H. Gharehveysi, R. Khataminejad, and J. Arab. 2014. Polymorphic variants of G1 and B4 from GDF9 of Dalagh sheep. Iranian Journal of Research on Animal Production, 10: 148-155. (In Persian).

24- Kumar, S., A. K. Mishra, A. P. Kolte, S. K. Dash, and S. A. Karim. 2008. Screening for Booroola (FecB) and Galway (FecXG) mutations in Indian sheep. Small Ruminant Research, 80 (1-3): 57-61.

25- Lin, J., Z. Du, C. Qin, J. f. Wang, and X. Ran. 2007. Polymorphism of BMP15 gene in Guizhou white goats. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 39(12): 21-24.

26- Lio, S. F., Y. L. Jiang, and L. X. Du. 2003. Study of BMPR-IB and BMP15 as candidate genes for fecundity in little tailed Han sheep. Acta Genetica Sinica, 8: 755–760.

27- Luis, V., P. Ricardo, M. T. Tejedor, L. Adolfo, and S. Isidro. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. Animal Reproduction Science, 110: 139–146.

28- Martinez-Royo, A., J. J. Jurado, J. P. Smulders, J. I. Martí, J. L. Alabart, A. Roche, E. Fantova, L. Bodin, P. Mulsant, M. Serrano, J. Folch, and J. H. Calvo. 2008. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. Animal Genetics, 39 (3): 294–297.

29- Michaidilis, G., M. Avdi, and V. Pappa. 2008. Reproductive performance and investigation of BMPR-IB and BMP15 gene mutations in Greek Chios and Florina sheep breeds. Arch Zootech, 11(1): 24-31.

30- Moghadaszadeh, M., M. R. Mohammadabadi, and A. K. Esmailizadeh. 2015. Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the litter Size in the Raini Cashmere goat. Iranian Journal of Genetics in the Third Millennium, 13: 4062-4067. (In Persian).

31- Monteagudo, L. V., R. Ponz, M. T. Tejedor, A. Lavina, and I. Sierra. 2009. A 17 bp deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. Animal Reproduction Science, 110: 139-146.

32- Moradband, F., G. Rahimi, and M. Gholizadeh. 2011. Association of polymorphisms in fecundity genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with litter size in Iranian Baluchi sheep. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 9: 1179-1183.

33- Gemmell, N. J. and J. Slate. 2006. Heterozygote advantage for fecundity. *PLoS One*, 1(1):125.
34- Pardeshi, V. C., M. N. Sainani, J. F. Maddox, P. M. Ghalsasi, C, Nimbkar, and V. S. Gupta. 2005. Assessing the role of FecB mutation in productivity of Indian sheep. Current Science, 89 (5): 887–890.

35- Paz, E., J. Quinones, S. Bravo, H. H Montaldo, and N. Sepulveda. 2015. Genotyping of BMPR1B, BMP15 and GDF9 genes in Chilean sheep breeds and association with prolificacy. Animal Genetics, 46: 98-99.

36- Pirkhezranian, Z., A. Mohammad Hashemi, M. Tahmorthpour, and N. Pirani. 2015. Polymorphhism in second exon of BMP 15 gene in Sangsari sheep of Iran. Iranian Journal of Animal Science Research, 6 (4): 381-387. (In Persian).

37- Polley, S., S. De, B. Brahma, A. Mukherjee, P. Vinesh, S. Batabyal, J. S. Arora, S. Pan, A. K. Samanta, T. K. Datta, and S. L. Goswami. 2010. Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. Tropical Animal Health and Production, 42(5): 985-993.

38- Polley, S., S. De, S. Batabyal, R. Kaushik, P. Yadav, and J.S. Arora. 2009. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. Small Ruminant Research, 85: 122–129.

39- Shahmohammadi, L. 2010. Identify polymorphisms GDF9, BMP15 and FecB genes effective twining by PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques in Zel sheep. M.Sc Thesis, University of Gorgan. (In Persian).

40- Solimani, B., M. G. Rahimi, and B. Chaharaein. 2011. The segregation of exon 2 BMP15 gene on twining and traits of weight in Sanjabi sheep. Iranian Journal of Biology, 24(4): 487-493. (In Persian).

41- Tajangookeh, H. D., A. R. Shahneh, M. J. Zamiri, M. Daliri, H. Kohram, and A. Nejati-Javaremi. 2009. Study of BMP15 gene polymorphism in Iranian goats. African Journal of Biotechnology, 8(13): 2929-2932.

42- Vacca, G. M., A. Dhaouadi, M. Rekik, V. Carcangiu, M. Pazzola, and M. L. Dettori. 2010. Prolificacy genotypes atBMPR 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. Small Ruminant Research, 88(1): 67-71.

43- Wang, Q. G., F. G. Zhong, H. Li, X. H. Wamg, S. R. Liu, X. J. Chen, and S. Q. Gan. 2005. Detection of major gene on litter size in sheep. Yi. Chuan xue bao, 27(1):8.

44- Wang, Q. G., F. G. Zhong, H. Li, X. H. Wang, S. R. Liu, and X. J. Chen. 2003. The polymorphism of BMPR-IB gene associated with litter size in sheep. Grass-feeding Livestock, 2: 20-23.

45- Wang, Y., L. Yuanxiao, Zh. Nana, W. Zhanbin, and B. Junyan. 2011. Polymorphism of Exon 2 of BMP15 Gene and Its Relationship with litter size of Two Chinese goats. Asian-Australian Journal of Animal Sciences, 24(7): 905-911.

46- Zamani, P., R. Abdoli, A. Deljou, and H. Rezvan. 2015a. Polymorphism and bioinformatics analysis of growth differentiation factor 9 gene in Lori sheep. Annals of Animal Science, 15(2):337-348.

47- Zamani, P., S. Nadri, R. Saffaripour, A. Ahmadi, F. Dashti, and R. Abdoli. 2015b. A new mutation in exon 2 of the bone morphogenetic protein 15 gene is associated with increase in prolificacy of Mehraban and Lori sheep. Tropical Animal Health and Production, 47(5): 855-860.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 2, Summer 2019, p. 247-257

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۵۷-۲۴۷

Investigation of $FecX^I$, $FecX^H$ and $FecX^B$ Polymorphism in BMP15 Gene in Lac Qashqai and Bahmaei Sheep Breeds at Kohkiloueh and Boyerahmad Province

M. Muhaghegh-Dolatabady[1]*- A. Moradalipour[2]- F. Mansori[2]- F. Fattahy[2] - Z. Sallehi[2]

Received: 14-01-2018
Accepted: 29-12-2018

Introduction Litter size is an important economic trait in sheep breeding which is influenced by genetics and environment factors. Application of phenotypic data in traditional breeding programs is a time consuming process. Thus, marker assisted selection (MAS) play an important role for genetic improvement of reproduction efficiency. Since, there has been great interest in the identification of major genes that influence fecundity traits in sheep. Three of these fecundities identified genes are bone morphogenetic protein receptor type IB (*BMPRIB*) or Activin Like Kinase 6, known as FecB located on chromosome 6; growth differentiation factor (*GDF9*), known as FecG located on chromosome 5 and bone morphogenetic protein 15 (BMP15), known as FecX located on the X chromosome. The BMP15) is expressed in oocytes where encodes for a mature peptide of 125 amino acids that stimulate the proliferation rate of the granulose cells and thus it seems to be essential in folliculogenesis. Some mutations in BMP15 gene are reported to increase fertility rate. Six different point mutations i.e. $FecX^I$ and $FecX^H$ in the Inverdale and Hanna breeds, respectively, $FecX^L$ in the Lacaune, $FecX^G$ and $FecX^B$ in the Cam-bridge and Beclare breeds, respectively and the $FecX^R$ in Raza Aragoneza breed have been identified in BMP15 gene. In this study, the $FecX^B$, $FecX^H$ and $FecX^I$ mutations at the BMP15 gene were investigated by PCR–RFLP in Lac Ghashghaei and Bahmaei sheep breeds. The $FecX^B$ (G to T nucleotide change) was detected using *Dde*I; the wild-type strand was cleaved. $FecX^H$ (C to T nucleotide change) was detected using *Spe*I, the mutation-type strand was cleaved and $FecX^I$ (T to A nucleotide change) was detected using *Xba*I; the mutation-type strand was cleaved.

Materials and Methods Blood samples were taken from 92 ewes according to data on litter size at the last lambing (Lac Ghashghaei: 24 single and 24 double lambing, Bahmaei: 22 single and 22 double lambing). The animals of the Lac Ghashghaei and Bahmaei breeds originate from two farms in Gachsaran and Dehdasht, respectively. Then, genomic DNA was isolated from whole blood using the DNA Extraction Kit according to the manufacturer's instructions. Required parts of BMP15 gene were amplified using specific primers (fragment of 204 bp from $FecX^I$, fragment of 235 bp of $FecX^H$ and fragment of 153 bp of $FecX^B$) through Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR products of amplified fragments were digested by *Xba*I, *Spe*I and *Dde*I restriction enzymes and visualized by agarose gel electrophoresis, separately.

Results and Discussion Sheep breeding is the major activity in the Kohkiloueh and Boyerahmad province of Iran and is very important in the rural economy of this region. Although litter size is an important trait that affects the profitability of sheep production, but the litter size of almost all sheep breeds of this province is low. In this study, PCR-RFLP method was used to identify three mutations ($FecX^I$, $FecX^H$ and $FecX^B$) of BMP15 gene in Lac Ghashghaei and Bahmaei ewes. As expected, the size of PCR production for $FecX^I$,

1- Associate Prof of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
2- MSc graduated of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
(*- Corresponding Author Email: mmuhaghegh@yu.ac.ir)

FecX^H and *FecX*^{B} loci were 204, 235 and 153 bp, respectively. After digestion of amplified fragments with specific restriction enzyme, the three earlier mentioned mutation sites were not detected in Lac Ghashghaei and Bahmaei sheep and only the wild-type genotype (++) was observed in both breeds for each mutation of BMP15 gene. In more detail, restriction digestion of amplified fragments for *FecX*^{B} locus resulted DNA fragments with 31 and 122 bp. The wild type of this locus has one restriction site and this means that *FecX*^{B} mutation was not detected in two breeds of this study and animal are homozygous for wild type allele of this locus. The resulted PCR products were digested with *Spe*I and *Dde*I restriction enzymes for *FecX*^{H}, *FecX*^{I} loci revealed DNA fragments with 235 and 204 bp, respectively. The mutant allele of *FecX*^{H}, *FecX*^{I} loci has one restriction site and enzyme digestion will be resulted in 2 DNA fragments while the wild type allele with no restriction site, resulted in one DNA fragments with the size. It means all 92 Lac Ghashghaei and Bahmaei ewes sampled were homozygous wild allele (++) for *FecX*^{H}, *FecX*^{I} loci.

Conclusion The obtained results of this study indicated that there was an absence of three BMP15 mutations (*FecX*^{B}, *FecX*^{H} and *FecX*^{I}) among the Lac Qashqai and Bahmaei sheep breeds sampled in the Kohkiloueh and Boyerahmad province, it seems genetic factor responsible for litter size is not related to reported mutated alleles of *BMP15* gene and therefore other prolificacy related genes should be investigated in these breeds using a larger sample size.

Keywords: *BMP15* Gene, Fecundity, Polymorphism, Sheep.